

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E PATOLOGICA

XXVI CICLO



TESI DI DOTTORATO

Ruolo di FK506 Binding Protein 51 (FKBP-51) nei linfomi cutanei a cellule T

Relatore

Ch.mo Prof. Staibano Stefania

Candidato

Dott.ssa Silvia Varricchio

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Indice

1. Introduzione	2
I Linfomi cutanei	2
• Classificazione	
• Diagnosi	
• Terapia	
I linfomi cutanei a cellule T (CTCL)	6
• Micosi fungoide	
• Disordini Linfoproliferativi CD30+	
• Patogenesi	
Aspetti molecolari dei CTCL	12
• NF- κ B	
• FKBP-51	
• FKBP-51 e NF- κ B	
2. Scopo dello Studio	22
3. Materiali e metodi	23
• Selezione dei casi	
• Immunoistochimica	
4. Risultati	25
5. Discussione e considerazioni conclusive	26
6. Bibliografia	29
Tabelle	37
Iconografia	38

1. Introduzione

I Linfomi cutanei

Per linfoma cutaneo (LC) si intende una proliferazione monoclonale di cellule linfoide a primitiva insorgenza cutanea, documentata attraverso l'esecuzione di accurate e complete indagini per la stadiazione che comprendono esami ematochimici, istologici e di diagnostica per immagini. Si tratta di un gruppo di malattie linfoproliferative caratterizzate da un'estrema eterogeneità in termini di presentazione clinica, prognosi e profilo immuno-molecolare [Willemze R, 1997; Willemze R, 2005]

Da un punto di vista epidemiologico si tratta di patologie non poi così rare, considerando che, tra i linfomi extranodali, sono al secondo posto, per ordine di frequenza, dopo quelli del tratto gastroenterico costituendo circa il 7% di tutti i linfomi [Groves FD, 2000]. Queste forme di linfoma hanno un'incidenza variabile a seconda della posizione geografica e dell'origine etnica della popolazione: in Asia, in alcuni stati degli USA e nel bacino del Mar dei Caraibi, infatti, risultano più diffusi alcuni linfomi a cellule T in relazione alla diffusione endemica del virus onco-trasformante HTLV-1 [Swerdlow S, 2008]. I LC vengono suddivisi in linfomi di derivazione dalle cellule T/NK (CTCL), dalle cellule B (CBCL), ed in tumori maligni a cellule emopoietiche immature (piuttosto rari).

Classificazione

I LC sono stati singolarmente descritti nella classificazione della WHO/EORTC del 2005 che nasce dalla revisione delle due precedenti classificazioni redatte rispettivamente dalla EORTC (Organizzazione Europea per la Ricerca e il Trattamento del Cancro) nel 1997 e poi dalla WHO (World

Health Organization) nel 2001, sulla base dell'integrazione di dati clinici, istologici, immunofenotipici e genotipici [Willemze R 2005].

Questa classificazione è stata definita come "un matrimonio pragmatico tra due giganti" in quanto ha una notevole rilevanza clinica e prognostica e delinea in modo netto i LC rispetto alle corrispettive forme nodali [Slater DN, 2005]

Peculiare in questa nuova classificazione è l'intento di descrivere entità di linfoma rare ed eterogenee, che presentano specifici pattern immunoistochimici e molecolari, con conseguenti implicazioni dal punto di vista diagnostico e terapeutico.

L'indiscutibile valore scientifico e pratico della classificazione WHO/EORTC del 2005 ha trovato conferma nel suo recepimento nell'edizione 2008 (IV edizione) della classificazione WHO delle neoplasie dei tessuti ematopoietici e linfoidi che rappresenta un aggiornamento delle entità precedentemente descritte [Swerdlow S 2008]; ognuna di esse viene singolarmente riconosciuta ed integrata in una classificazione generale dei linfomi nodali ed extranodali con piccole modifiche nella terminologia [Kempf W 2010]. La classificazione WHO/EORTC e la IV edizione della classificazione WHO sono oggi universalmente accettate e comunemente impiegate dalla comunità scientifica internazionale (Tabella 1).

Tabella 1: Classificazione dei linfomi cutanei

Classificazione dei linfomi cutanei WHO/EORTC	Classificazione dei tessuti linfoidei WHO – linfomi cutanei (ICD-O Code)
<p><u>Linfomi cutanei a cellule T e NK</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Micosi fungoide (MF) - MF varianti e sottotipi MF follicolotropa Reticulosi pagetoide Granulomatous slack skin - Sindrome di Sezary - Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto (ATLL) - Disordini linfoproliferativi primitivi cutanei CD30+ <ul style="list-style-type: none"> Linfoma primitivo cutaneo anaplastico a grandi cellule (C-ALCL) Papulosi linfomatoide - Linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (SPTL) - Linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T periferiche, “unspecified” - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo (provvisorio) - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ (provvisorio) - Linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ pleomorfo (provvisorio) 	<p><u>Neoplasie a cellule T e NK mature</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Micosi fungoide (MF) - MF varianti e sottotipi MF follicolotropa Reticulosi pagetoide Granulomatous slack skin - Sindrome di Sezary - Leucemia/linfoma a cellule T dell'adulto - Disordini linfoproliferativi primitivi cutanei CD30+ <ul style="list-style-type: none"> Linfoma primitivo cutaneo anaplastico a grandi cellule Papulosi linfomatoide - Linfoma subcutaneo simil-panniculitico a cellule T (fenotipo TCR α/β) - Linfoma extranodale a cellule T/NK, nasal type - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T periferiche, sottotipi rari - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T CD8+ aggressivo epidermotropo (provvisorio) - Linfoma primitivo cutaneo a cellule T γ/δ (provvisorio) - Linfoma primitivo cutaneo a piccole e medie cellule T CD4+ pleomorfo (provvisorio)
<p><u>Linfomi cutanei a cellule B</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma primitivo cutaneo a cellule B della zona marginale - Linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, altri - Linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B intravascolare 	<p><u>Neoplasie a cellule B mature</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Linfoma extranodale della zona marginale dei tessuti linfoidei associati alla mucosa (MALT) - Linfoma primitivo cutaneo del centro follicolare - Linfoma primitivo cutaneo diffuso a grandi cellule B, leg type - Linfoma diffuso a grandi cellule B, NOS - Linfoma primitivo cutaneo a grandi cellule B intravascolare
<p><u>Neoplasie dei precursori ematopoietici</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia ematodermica CD4+/CD56+ (linfoma blastico a cellule NK) 	<p><u>Neoplasie dei precursori</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Neoplasia a cellule blastiche dendritiche plasmocitoidi

Diagnosi

La diagnosi dei LC è basata su una attenta valutazione clinica e sull'esecuzione di una biopsia cutanea per l'esame istologico, indagini di immunoistochimica e biologia molecolare. E' necessario, infatti, distinguere i LC dai linfomi cutanei secondari (localizzazione cutanea di linfomi insorti a livello extracutaneo) e dai cosiddetti pseudo-linfomi della cute (malattie linfoproliferative cutanee di natura iperplastico-reattiva) [Rijlaarsdam JU 1990 ; Rijlaarsdam JU 1991].

Da un punto di vista clinico, il quadro cutaneo generalmente si caratterizza per la comparsa di lesioni papulari, in chiazza, in placca e/o nodulari isolate o coinvolgenti diverse sedi anatomiche a seconda del tipo di LC e della sua aggressività.

Le indagini su tessuto consentono l'identificazione morfologica dell'infiltrato cutaneo e la valutazione del fenotipo del clone linfocitario neoplastico mediante tecniche di immunoistochimica che prevedono l'uso di determinati anticorpi monoclonali per il riconoscimento degli antigeni di superficie.

Altre indagini eseguite includono la tipizzazione dell'infiltrato (T o B), la valutazione della monoclonalità delle catene leggere (kappa/lambda) delle immunoglobuline citoplasmatiche e la loro tipizzazione nei CBCL e, nei CTCL, la sottotipizzazione attraverso la valutazione di antigeni di rilevanza prognostica, come CD30, e l'identificazione di un eventuale fenotipo aberrante di entità rare e aggressive.

Nel momento in cui tutte queste metodiche porteranno alla formulazione della diagnosi di linfoma primitivo cutaneo, il paziente verrà sottoposto a ulteriori indagini cliniche, di laboratorio e strumentali per la stadiazione della patologia linfoproliferativa: tutto ciò è indispensabile per scegliere la terapia più appropriata fra le possibili opzioni terapeutiche.

Terapia

Le strategie di trattamento dei linfomi cutanei possono essere divise in due categorie: terapia locale cutanea e terapia sistemica. La terapia locale include: fotochemioterapia (PUVA terapia), chemioterapia topica e radioterapia (Total

skin electron beam irradiation, TSEBI). La terapia sistemica include: chemioterapia sistemica e altri agenti citotossici, fotoforesi, retinoidi, IFN e altri modificatori della risposta biologica [Jawed SI 2014].

La scelta della terapia dipende dallo stadio clinico e dall'analisi di molteplici altri fattori come aspetto istologico, fase della malattia, estensione, interessamento linfonodale o sistemico, età e presenza di comorbidità [Heald P 2000].

La combinazione di terapie diverse è un approccio terapeutico molto utilizzato. I linfomi cutanei primitivi a cellule T (CTCL, Cutaneous T Cell Lymphoma), dei quali il sottotipo più frequente è rappresentato dalla Micosi Fungoide (MF), rispondono per lungo tempo ai trattamenti topici o sistemici di associazione con steroidi, UV e retinoidi o all' $\alpha 2$ Interferone.

Gli stadi avanzati della MF, la Sindrome di Sezary (SS), gli ALC CD30-, e altre varianti rare come la Subcutaneous Panniculitis-like sono refrattari o rispondono solo per un breve periodo anche a trattamenti sistemici più aggressivi come la monochimioterapia, la polichimioterapia, gli anticorpi monoclonali anti-CD52 o la chemioterapia con reinfusione di Cellule Staminali Emopoietiche (CSE) autologhe o il trapianto di CSE allogeniche. Dopo una risposta di breve durata (in media 7 mesi) soprattutto i CTCL in fase avanzata, recidivano e si presentano resistenti ad ulteriori trattamenti.

I linfomi cutanei a cellule T (CTCL)

I linfomi cutanei a cellule T (CTCL) comprendono un gruppo eterogeneo di disordini linfoproliferativi caratterizzati dall'invasione cutanea di cellule T neoplastiche [Berger CL 2005, Guitart J 2006] .

I CTCL, a differenza della controparte nodale dove i linfomi di tipo B-cellulare sono la maggioranza, rappresentano il 65% dei LC e sono costituiti per il 90% dalle entità più conosciute, la micosi fungoide, la sindrome di Sezary e le malattie linfoproliferative primitive cutanee CD30+. [Bradford, 2009].

La classificazione del rimanente gruppo di CTCL è risultata negli anni confusa e difficoltosa, cosa che in verità non sorprende, vista l'eterogeneità e la rarità di

questi tumori. Nell'insieme essi rappresentano meno del 10% di tutti i CTCL. Con poche eccezioni queste forme sono clinicamente aggressive e richiedono spesso una chemioterapia sistemica. Essi sono rappresentati dal linfoma sottocutaneo simil-panniculitico CD8+(α/β +), il linfoma cutaneo NK/T extranodale nasal type e il linfoma T periferico non altrimenti specificato (CTCL NOS).

La micosi fungoide (MF) e la sindrome di Sézary (SS) insieme rappresentano le forme più comuni di CTCL. Queste sono patologie croniche che mostrano una notevole variabilità nella presentazione cutanea, nel quadro istologico, nel coinvolgimento del sangue periferico, nell'immunofenotipo e nella prognosi.

Micosi fungoide

La Micosi Fungoide (MF) rappresenta il prototipo dei CTCL ed è caratterizzata dalla proliferazione di linfociti T "helper" CD4+ , di piccola o media taglia con nucleo cerebriforme, a livello del derma superficiale.

E' stata descritta per la prima volta da Jean-Luis Alibert nel 1806 come una strana alterazione della cute, come di un fungo simil-tumorale a cui successivamente nel 1832 diede il nome di Micosi fungoide [Alibert JLM 1806]. A quel tempo, l'eziologia dell'alterazione era completamente sconosciuta e solo successivamente con Xavier Gillot e Louis Antoine Ranvier (1835 -1922) la Micosi Fungoide viene considerata come la manifestazione cutanea di un linfoma [Niermann C, 2008].

Si tratta della forma più frequente di CTCL, rappresenta circa il 50% di tutti i linfomi cutanei, colpisce preferenzialmente adulti ed anziani (età media 55-60 anni; rapporto M/F 2:1). Tuttavia, a volte vengono descritti casi anche tra i bambini e gli adolescenti [Willemze R, 2005]. Nonostante rappresenti la forma più comune di linfoma primitivo cutaneo, è una patologia rara, per cui sono relativamente pochi gli studi pubblicati su ampie casistiche di pazienti.

La MF ha un comportamento clinico di tipo indolente con una lenta progressione, nell'ordine degli anni o talora dei decenni. Essa mostra un

processo linfoproliferativo suddiviso in più tappe da lesioni a chiazza e placca a lesioni nodulo-tumorali o eritrodermia (Figura 1).

Esordisce con chiazze eritemato-squamose, localizzate caratteristicamente in zone non fotoesposte, come il tronco, regione glutea e la radice degli arti. Possono presentare inizialmente tendenza alla regressione spontanea, soprattutto dopo l'esposizione solare o all'utilizzo di farmaci corticosteroidi topici, per poi ripresentarsi nella stessa sede, con tendenza ad aumentare in numero e dimensioni. In questa fase, che può durare molti anni, l'aspetto istologico può risultare scarsamente specifico. E' presente un infiltrato di tipo polimorfo costituito da linfociti, istiociti, cellule dendritiche ed eosinofili, situato in sede perivascolare nel derma superficiale, con infiltrazione focale degli strati basali dell'epidermide.

Vi è poi evoluzione allo stadio di placca, con infiltrazione delle chiazze, e reperto istologico caratterizzato da un infiltrato a banda di cellule cerebriformi nel derma superficiale, spiccato epidermotropismo con linfociti intraepiteliali, spesso circondati da un alone chiaro e formazioni di teche linfocitarie intraepiteliali (microascessi di Pautier).

Lo stadio nodulo-tumorale rappresenta la fase finale della storia naturale della MF. Da un punto di vista istologico aumenta il numero di cellule linfoidi atipiche a citomorfologia pleomorfa, diminuiscono le cellule reattive, aumentano le plasmacellule e viene a mancare progressivamente il tipico epidermotropismo, mentre la patologia arriva a coinvolgere anche l'ipoderma (Figura 2). Negli stadi avanzati della malattia possono venire coinvolti i linfonodi e gli organi interni [Willemze R, 2005].

Nella classificazione WHO sono state descritte anche delle varianti della micosi fungoide.

La Micosi fungoide follicolotropa (o follicolare) è la variante più comune. Si presenta in forma di lesioni (papule e/o placche eritematose) che coinvolgono preferibilmente le strutture annessiali follicolari della testa e del collo ed è caratterizzata da un decorso clinico aggressivo con prognosi infausta.

La Reticulosi pagetoide è una variante ad andamento indolente della micosi fungoide che si presenta con placche solitarie o localizzate che interessano solitamente gli arti.

La Cute lassa granulomatosa e Micosi fungoide granulomatosa sono varianti con aspetti granulomatosi che si presentano con manifestazioni cliniche differenti, ma con aspetti istologici sovrapponibili che le rendono indistinguibili sulla base della sola osservazione morfologica.

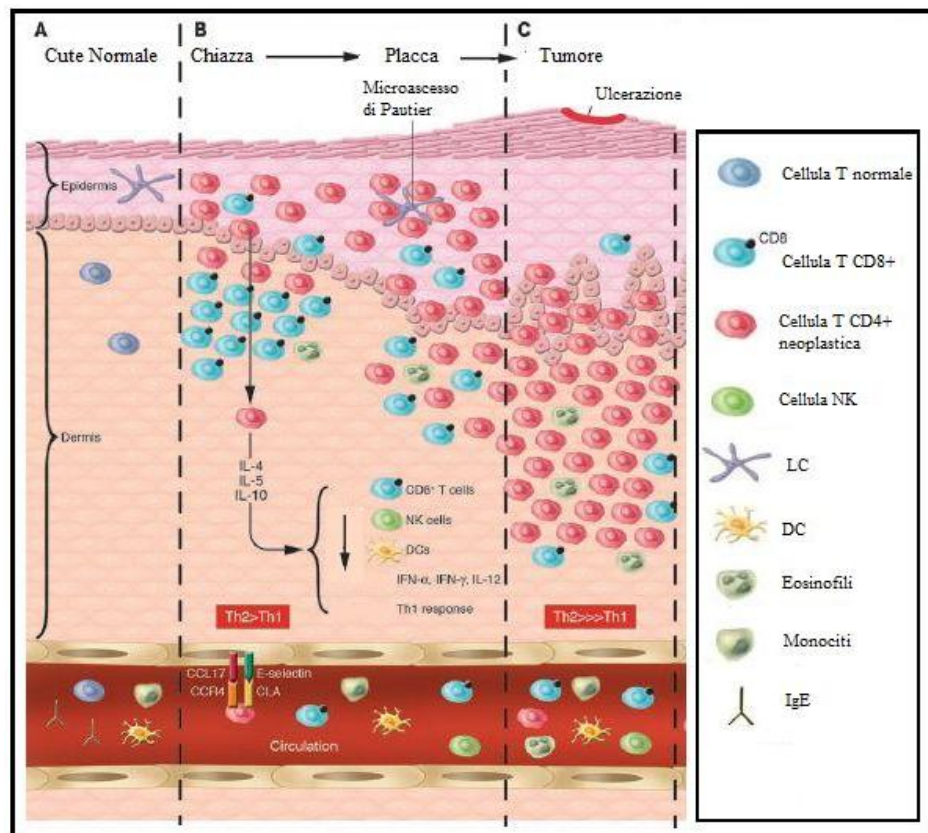


Figura 1: L'illustrazione mostra il processo linfoproliferativo suddiviso in più tappe della Micosi fungoide [Kim EJ, 2005]

Disordini Linfoproliferativi CD30+

I Disordini Linfoproliferativi CD30+ (DLCP) costituiscono il 25% di tutti i linfomi cutanei a cellule T ed hanno come comune denominatore istologico la presenza di grandi cellule atipiche CD30+, talora simil Hodgkin e Reed-Stenberg. Clinicamente si caratterizzano per un andamento prognostico favorevole con frequente regressione spontanea delle lesioni cutanee. Lo spettro dei DLCP CD30+ comprende la papulosi linfomatoide (PL), il linfoma a grandi cellule anaplastiche (ALCL) e le lesioni "borderline", caratterizzate da aspetti clinico-patologici intermedi fra la PL e l'ALCL [Kempf W, 2006].

Patogenesi

La patogenesi dei CTCL non è stata ancora del tutto chiarita. L'ipotesi più accreditata vede l'origine della proliferazione incontrollata del clone neoplastico linfocitario, nella stimolazione antigenica cronica dei linfociti T. [Girardi M, 2004]. L'attivazione linfocitaria continua e incontrollata, infatti, conduce dapprima allo sviluppo di una condizione pre-neoplastica linfoproliferativa che facilita l'accumulo di mutazioni in oncogeni e oncosoppressori e successivamente, una volta alterati i processi di controllo della replicazione, di riparo del DNA e dell'apoptosi, alla formazione e progressione del tumore [Wong HK, 2011].

Le cause di questa persistente attivazione restano, però, poco chiare e sono per questo oggetto di diversi studi che hanno avanzato varie ipotesi eziologiche.

Numerosi dati convergono su un'eziologia virale, più frequentemente da HTLV-1 e EBV. L'HTLV-1 è direttamente implicato nella patogenesi della leucemia a cellule T dell'adulto, nelle cui cellule il virus è sempre integrato, mentre rimane discusso il ruolo di HTLV-1 nello sviluppo di alcune forme di linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) [Wood GS, 1997; Pancake BA, 1995; Zucker-Franklin D, 1994].

Alcuni studi indicano la possibilità che la stimolazione linfocitaria cronica possa riconoscere una origine immunitaria, che andrebbe ricercata nell'interazione tra linfociti e cellule dendritiche presenti nel microambiente

cutaneo. In supporto a questa ipotesi vi è l'incrementato numero di cellule presentanti l'antigene (APC) trovato nelle lesioni precoci di micosi fungoidi [Pigozzi B, 2006] e l'iperespressione di molecole di superficie che partecipano alla presentazione antigenica e all'attivazione linfocitaria come B7, CD40, CD28, CD40L, TRL2 e 4 [Storz M, 2001; Nickoloff BJ, 1994; Jarrousse V, 2006; Ermertcan AT, 2011].

Ci sono idee contrastanti, invece, sulle relazioni tra fattori ambientali, con particolari riferimenti alle industrie petrolifere, e lo sviluppo di linfomi cutanei a cellule T [Greene MH, 1979; Morales 2004].

Altri studi hanno rivolto particolare attenzione alla valutazione di un ruolo linfoproliferativo svolto da parte di alcuni geni la cui espressione risulta alterata nei CTCL con conseguente alterazione dei processi di proliferazione ed apoptosi. Sono stati descritti casi di amplificazione e sovraespressione del gene JUN-B, un fattore di trascrizione nucleare coinvolto nell'attivazione dei linfociti T [Mao X, 2003; Mao X, 2004; Mao X, 2008], casi di attivazione costitutiva di STAT3 negli stati avanzati di micosi fungoide [Nielsen M, 1999; Sommer VH, 2004] casi di ridotta espressione di Fas (CD95) che comporta una riduzione della morte programmata dei linfociti T attivati e quindi può favorire la progressione tumorale [Zoi-Toli O, 2000].

Negli ultimi anni, infine, diversi studi hanno attribuito al fattore di trascrizione NF- κ B un ruolo di regolatore trascrizionale chiave nella patogenesi dei CTCL [Chang TP, 2013]. Proprio sull'analisi del pathway di NF- κ B ho voluto focalizzare la mia attenzione in questo lavoro, alla luce di nuove scoperte riguardanti l'interazione tra NF- κ B e l'immunofilina FKBP-51, consapevole che una maggiore comprensione della biologia cellulare e dell'immunologia dei linfomi cutanei permetterebbe di definirne meglio le basi biologiche e di mettere a punto trattamenti terapeutici più efficaci.

Aspetti molecolari nei CTCL

I CTCL mostrano, frequentemente, un decorso clinico indolente nelle fasi iniziali e un comportamento più aggressivo nelle fasi avanzate caratterizzate dalla capacità delle cellule T neoplastiche di resistere agli stimoli apoptotici (quali, ad esempio, quelli indotti dagli agenti chemioterapici convenzionali) con conseguente frequente insuccesso dei trattamenti terapeutici e mancata remissione a lungo termine della malattia. [Kim EJ, 2005; Querfeld C, 2005].

I meccanismi molecolari responsabili della resistenza all'apoptosi nelle cellule tumorali possono essere molteplici, in quanto molteplici sono i complessi proteici e i pathways coinvolti [Ouyang L, 2012].

Per quanto riguarda i CTCL, negli ultimi anni, diversi studi hanno attribuito la capacità di chemioresistenza delle cellule neoplastiche alla persistente attivazione del pathway di NF- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) [Chang TP, 2013; Sors A, 2006; Döbbeling U, 2007; Izban K.F, 2000; Sors A, 2008].

NF- κ B è un fattore di trascrizione sequenza-specifico ben conosciuto per il suo coinvolgimento nell'infiammazione e nella risposta immunitaria innata. Inoltre è sempre più accertato un suo coinvolgimento nei processi di tumorigenesi, progressione neoplastica, metastasi e resistenza ai chemioterapici, in diversi tumori [Di Donato JA, 2012].

Nei CTCL, NF- κ B agisce come regolatore trascrizionale chiave nella loro patogenesi, regolando da un lato l'espressione di geni pro-infiammatori ed anti-apoptotici che contribuiscono alla aumentata proliferazione e sopravvivenza delle cellule neoplastiche, e dall'altra l'espressione di geni anti-infiammatori che permettono alle cellule neoplastiche di evadere la sorveglianza immunitaria determinando la natura immunosoppressiva dei CTCL [Chang TP, 2013].

Negli ultimi anni, diverse evidenze sperimentali hanno suggerito un importante ruolo per l'immunofilina FKBP-51 nel controllo del pathway di NF- κ B in diversi tipi di neoplasie maligne umane, con particolare ruolo nell'induzione di chemioresistenza [Romano MF, 2004; Bouwmeester T, 2004; Avellino R, 2005; Periyasamy S, 2010; Romano S, 2010].

L'attività isomerasica di FKBP51 risulta, infatti, fondamentale per la funzione del complesso IKK responsabile dell'attivazione di NF- κ B [Romano M.F, 2004].

NF- κ B

NF- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) è una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria alle infiammazioni. Esso agisce, principalmente, modulando i pathways della proliferazione, dell'apoptosi, dell'attivazione, sviluppo e sopravvivenza delle cellule B [Ghosh S, 1998]

Inoltre è sempre più accertato un suo coinvolgimento nello sviluppo tumorale [Greten FR., 2004]. È stato descritto per la prima volta nel 1986 come un fattore nucleare necessario per la trascrizione della catena leggera κ delle immunoglobuline nei linfociti B, e da qui il nome nuclear factor- κ B [Sen R. 1986; Sen R. 1986]

La famiglia NF- κ B è costituita da cinque membri: RELA, RELB, c-REL, p50 e p52 i quali dimerizzano in complessi attivi RELA/p50, RELA/RELA, p50/REL, RELA/REL e RELB/p52 o in omodimeri (p50/p50 e p52/p52) inattivi [Hansen SK, 1994; Brown AM, 1994; Kang SM, 1992]

Nella maggior parte delle cellule, il complesso proteico è presente nel citoplasma in una forma inattiva legata a specifiche proteine inibitrici I κ Bs che sono in grado di mascherarne il segnale di localizzazione nucleare (NLS) [Ghosh S, 1998]. Anche le proteine I κ B sono una famiglia di proteine omologhe note come I κ B- α , I κ B- β , I κ B- ϵ , I κ B- γ , Bcl-3, e i derivati dai precursori p100 e p105 [Baldwin AS Jr. 1996].

I fattori NF- κ B possono essere attivati da una vasta gamma di stimoli come citochine pro-infiammatorie (TNF- α , interleuchina-1 β , ligando CD40), agenti che danneggiano il DNA, recettori della famiglia Toll-like (TLR), esposizione a lipopolisaccaridi o agenti virali (HTLV, EBV). Esistono due vie di attivazione del complesso NF- κ B: classica e alternativa. La prima, mediata da stimoli infiammatori, prevede il reclutamento del complesso I κ B kinase (IKK).

IKK è un complesso proteico costituito da due subunità catalitiche IKK α e IKK β , e dalla subunità regolatoria IKK γ /NEMO. Il complesso IKK viene attivato a monte dalla chinasi MAP3K (mitogen-activated protein 3 kinase) che fosforila le subunità IKK α e IKK β . IKK è in grado di fosforilare I κ B promuovendo l'ubiquitinazione e la degradazione mediante proteosoma dell'inibitore. Il complesso NF- κ B, così attivo, trasloca nel nucleo dove regola la trascrizione di numerosi geni, mediante il legame con specifiche kB [Ghosh S, 1998; Karin M, 2000]. La via alternativa, invece, è mediata da alcuni membri della famiglia del tumour necrosis factor i quali promuovono la degradazione di p100, e la formazione di una nuova proteina (p52), associata a RELB, capace di traslocare nel nucleo dove attiva il processo di trascrizione. Nella via alternativa IKK α agisce in maniera NEMO-indipendente avvalendosi dell'aiuto della chinasi NIK (chinasi che induce NF- κ B) [Ghosh S, 1998; Karin M, 2000] (Figura 3).

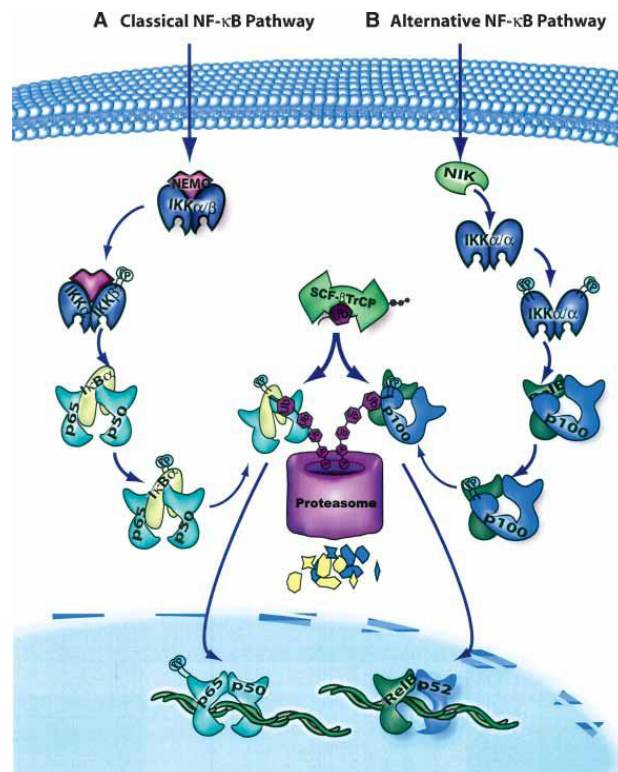


Figura 3: Rappresentazione delle due possibili vie di attivazione di NF- κ B [Hayden MS, 2004]

NF- κ B regola un elevato numero di geni tra i quali quelli codificanti per citochine (per es. IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, INF β , TNF α), chemochine (per es. IL-8, MCP-1, MCP-1 α , RANTES), molecole di adesione (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina), enzimi inducibili (iNOS e COX-2), fattori antiapoptotici (Bcl-2, A1/Bfl1, Bcl-xL, c-FLIP, c-IAP1, c-IAP2, survivin, TRAF-1, TRAF-2), fattori di proliferazione (ciclina D1, c-MYC). Tra i vari geni bersaglio vi è lo stesso I κ B- α che una volta risintetizzato, rientra nel nucleo, si complessa a NF- κ B e ne blocca l'attività trascrizionale. Questo rappresenta un meccanismo di feedback negativo che limita gli effetti trascrizionali dell'attivazione di NF- κ B. Nei CTCL, NF- κ B agisce come regolatore trascrizionale chiave nella patogenesi, regolando da un lato l'espressione di geni anti-infiammatori ed anti-apoptotici che contribuiscono alla aumentata proliferazione e sopravvivenza delle cellule neoplastiche, e dall'altra l'espressione di geni anti-infiammatori che permettono alle cellule neoplastiche di evadere la sorveglianza immunitaria determinando la natura immunosoppressiva dei CTCL [Chang TP, 2013].

La consapevolezza del ruolo centrale svolto da NF- κ B nello sviluppo e nella progressione tumorale, ha incentivato numerosi studi finalizzati a correlare la deregolazione del pathway di NF- κ B con la diagnosi, la prognosi e la risposta terapeutica e a sviluppare, quindi, possibili strategie farmacologiche contro NF- κ B.

FKBP-51

FKBP-51 è un membro delle proteine FKBP (FK506 Binding Proteins) che appartengono alla famiglia delle immunofiline, abbondanti proteine citosoliche con attività isomerasica, bersaglio di farmaci immunosoppressori come la rapamicina ed il tacrolimo (FK506) [Dornan, J, 2003]. Oltre alla capacità di legare farmaci immunosoppressori, le immunofiline presentano un'altra proprietà caratteristica ossia l'attività Peptidil-Prolil Isomerasica (PPIase) che catalizza l'isomerizzazione dei legami ammidici dalla forma cis alla forma trans nelle proteine substrato [Dornan, J., 2003; Fischer, G.; Aumüller, T. 2003, 148, 1]. Nell'uomo fino ad oggi sono state identificate 15 proteine FKBP denominate a seconda del loro peso molecolare [Somarelli JA, 2008]. La prima FKBP ad essere stata descritta nel dettaglio è stata FKBP-12, un'immunofilina ubiquitaria di 11,8 kDa altamente conservata negli eucarioti.

Si tratta di una classe di enzimi ubiquitari trovati in tutti gli organismi caratterizzati da una sequenza amminoacidica altamente conservata dal punto di vista filogenetico [Fischer, G.; Aumüller, T. 2003]. Da un punto di vista strutturale, le proteine FKBP possono presentare uno o più domini contenenti l'attività Peptidil-Prolil Isomerasica (PPIase), associati ad ulteriori domini funzionali: dominio TPR (tetratricopeptide repeat) coinvolto nelle interazioni proteina-proteina, dominio elica-ansa-elica noto come "EF-hand" coinvolto nel legame con gli ioni Ca^{2+} , regione di legame agli acidi nucleici, dominio trans-membrana, sequenza segnale di localizzazione nucleare ed una sequenza segnale per il reticolo endoplasmatico. La presenza di diversi domini funzionali è indicativa della capacità di queste proteine di svolgere diverse funzioni essenziali per la vita della cellula [Dornan, J.; 2003; Fischer, G.; Aumüller, T, 2003; Somarelli 2008].

FKBP-51 è stata clonata per la prima volta, nel 1995, nel topo, in cui la sua presenza è apparsa ristretta ai linfociti T [Baughman G, 1995]. Studi successivi nell'uomo hanno confermato che è abbondantemente espresso nei linfociti T e in diversi altri tessuti, sebbene la sua non risulti una distribuzione uniforme [Baughman G, 1997].

FKBP-51 è codificata dal gene FKBP5 localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 (6p21.31), costituito da 13 esoni e 12 introni che si estendono per più di 150 kb. L'organizzazione genica di FKBP5 è simile a quella del gene FKBP4 codificante per l'immunofilina FKBP-52, indicando una stessa derivazione da un comune gene presente in un invertebrato ancestrale [Cioffi DL, 2011].

FKBP-51 è una proteina di 51 KDa, contenente tre domini TPR a livello C-terminale responsabili dell'interazioni con una serie di proteine come le heat shock protein HSP90 e HSP70 e i recettori degli ormoni steroidei, e due domini FKBP (FK1 e FK2) a livello N-terminale di cui solo uno (FK1) funzionale dotato di attività isomerica [Dornan, J, 2003; Fischer, G.; Aumüller, 2003; Somarelli JA, 2008] (Figura 4).

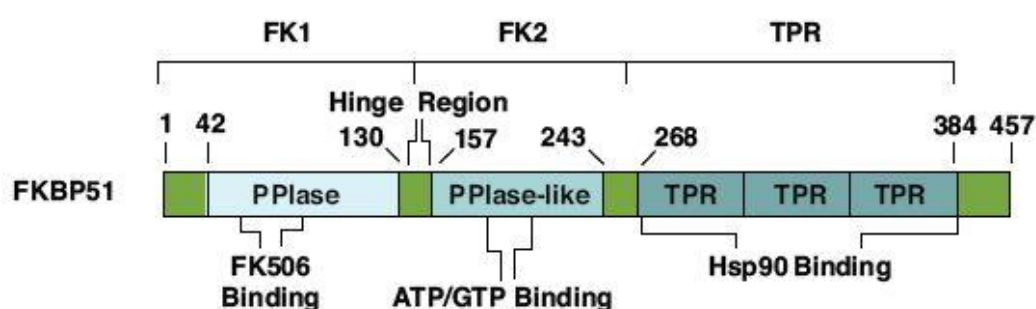


Figura 4: Rappresentazione schematica della struttura di FKBP-51 [Stechschulte LA, 2011]

FKBP-51 partecipa a diversi meccanismi che regolano la crescita e la differenziazione cellulare suggerendo per questa immunofilina un ruolo chiave sia in condizioni fisiologiche che in condizioni patologiche preneoplastiche e neoplastiche.

Tra le funzioni di FKBP-51 vi è quella di partecipare alla regolazione del sistema immunitario indotta da farmaci immunosoppressori antagonisti della calcineurina (CaN) come FK506 (o tacrolimo). La CaN è una serina/treonina fosfatasi, Ca^{2+} /Calmodulina-dipendente, essenziale per la trasduzione del segnale del TCR nei linfociti T mediante attivazione del fattore di trascrizione

NF-AT (Nuclear Factor of Activated T lymphocytes). NF-AT, una volta defosforilato dalla CaN, si attiva ed è in grado di traslocare dal citoplasma al nucleo dove induce la trascrizione del gene della IL-2 e di altre molecole coinvolte nel processo di attivazione dei linfociti T. FK506 può interagire o con FKBP-12 o FKBP-51 formando un complesso FK506-immunofilina in grado di inibire la CaN e la successiva defosforilazione e attivazione di NF-AT con conseguente blocco della proliferazione dei linfociti T (Baughman, G, 1995; Hogan, P.G, 2003; Weiwad, M., 2006).

FKBP-51 interagisce, inoltre, con i recettori intracellulari dei glucocorticoidi, degli estrogeni, dei progestinici e dei mineralcorticoidi formando un etero complesso con le proteine Hsp70-Hsp90. In generale FKBP-51 modula in senso negativo la risposta agli ormoni steroidei, fatta eccezione per l'azione sul recettore degli androgeni (AR) la cui attività viene incrementata. Alcuni studi hanno, infatti, correlato l'elevata espressione o l'incrementata attività dell'immunofilina all'eziologia del carcinoma prostatico [Stechschulte LA, 2011].

Nel sistema nervoso FKBP-51 regola la clearance della proteina tau e stabilizza i microtubuli contribuendo all'integrità del citoscheletro e alla sopravvivenza dei neuroni. L'eccessivo accumulo di proteina tau porta ad alterazioni del citoscheletro tipiche di un gruppo di malattie neurodegenerative chiamate tauopatie, tra cui c'è il morbo di Alzheimer [Jinwal UK, 2010; Goedert M, 2000; Alonso A, 2001.].

Un'altra via di segnalazione che vede coinvolto FKBP-51 è la via di trasduzione del segnale della PI3K/AKT/mTOR che ha una funzione critica nella proliferazione cellulare, nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nel metabolismo. FKBP-51 sembra regolare negativamente questa via favorendo l'interazione tra la chinasi Akt e il suo regolatore negativo PHLPP che catalizza la defosforilazione di Akt a livello della S473. La down-regolazione di FKBP51 riduce l'interazione tra Akt e PHLPP e aumenta i livelli di Akt fosforilato e attivo con conseguente aumento della sopravvivenza cellulare e della chemioresistenza. L'identificazione di questa funzione di

FKBP-51 come proteina scaffold nella regolazione di Akt, ha permesso di ipotizzare per questa immunofilina un ruolo come potenziale biomarker sia di tumorigenesi che di chemioresistenza [Wang L.. 2011].

Recentemente è emerso, inoltre, il ruolo essenziale svolto da FKBP-51 nell'attivazione di NF- κ B e dei geni NF- κ B-regolati. FKBP-51 agisce con la sua attività isomerasica, sulla subunità IKK α permettendo il corretto funzionamento del complesso I κ B kinase (IKK) che, mediante la fosforilazione e degradazione ubiquitino-dipendente dell'inibitore I κ B, induce l'attivazione del pathway di NF- κ B [Romano MF, 2004; Avellino A, 2005; Romano S, 2010].

FKBP-51 può regolare l'attivazione di NF- κ B anche attraverso un ulteriore meccanismo di tipo indiretto che prevede l'inibizione della risposta agli ormoni steroidei. I glucocorticoidi sono, infatti, potenti inibitori del pathway di NF- κ B poiché inducono la trascrizione dell'inibitore I κ B α che sequestra NF- κ B in un complesso citoplasmatico inattivo [Auphan, N, 1995]. Inoltre è stato visto che la subunità RelA interagisce con il recettore dei glucocorticoidi che ne altera la funzione [Ray A, 1994, Scheinman RI, 1995, Caldenhoven E, 1995]. FKBP-51 che modula in senso negativo la risposta ai glucocorticoidi favorisce in questo modo l'attivazione di NF- κ B.

FKBP-51 e NF- κ B

Diverse sono state le evidenze scientifiche che hanno supportato l'ipotesi di un possibile ruolo dell'immunofilina FKBP-51 nel controllo del pathway di NF- κ B [Romano S, 2011].

Il primo lavoro scientifico che mette in luce una possibile interazione tra FKBP-51 e NF- κ B è quello di *Giraudier* nel 2002, sulla mielofibrosi idiopatica, una sindrome mieloproliferativa caratterizzata dalla proliferazione anomala di megacariociti e fibrosi del midollo osseo. Gli autori di questo lavoro correlano la crescita dei megacariociti indipendente da citochine, all'overespressione di FKBP-51 che risulta in grado di inibire la calcineurina, coinvolta nella defosforilazione di I κ B e nel controllo di NF- κ B. L'azione di

FKBP-51 sembra favorire, indirettamente, l'attivazione di NF- κ B che promuove l'espressione di molecole antiapoptotiche come Bcl-xL responsabili della sopravvivenza dei megacariociti [Giraudier S, 2002].

L'interazione ipotizzata da *Giraudier* viene dimostrata due anni più tardi da *Bouwmeester* che studiando l'attivazione del pathway di NF- κ B indotto dal TNF α , co-purifica FKBP-51 con IKK α , IKK ϵ , TAK1 e MEKK1 e indica l'immunofilina come potenziale cofattore di più chinasi coinvolte nella regolazione di NF- κ B [Bouwmeester T, 2004].

Sempre nel 2004 un ulteriore studio descrive FKBP-51 come fattore essenziale per l'attivazione di NF- κ B indotta da agenti chemioterapici nel melanoma [Romano MF, 2004]. In questo lavoro si dimostra che l'immunosoppressore rapamicina è in grado di contrastare l'attivazione di NF- κ B indotta da doxorubicina e di ridurre la traslocazione, inibendo la capacità di IKK di fosforilare I κ B α . L'effetto della rapamicina appare essere indipendente dal blocco del pathway PI3K/AKT/mTOR, principale target conosciuto della rapamicina, mentre è riprodotto dalla deplezione di FKBP-51. L'inibizione di NF- κ B determina un effetto di sensibilizzazione all'apoptosi nel melanoma, a causa della mancata induzione dei geni Bcl-2 e c-IAP1 coinvolti nella resistenza delle cellule tumorali alla doxorubicina [Romano MF, 2004] (Figura 5).

Lo stesso effetto sensibilizzante della rapamicina sull'azione dei farmaci appartenenti alla famiglia delle antracicline, è stato confermato nella leucemia linfoblastica acuta (cALL) [Avellino R, 2005]. Gli autori hanno dimostrato che la rapamicina attiva l'apoptosi sia somministrata da sola che in associazione alla doxorubicina. L'effetto cooperativo tra rapamicina e doxorubicina risulta essere dovuto all'inibizione dell'attivazione di NF- κ B mediata da FKBP-51 [Avellino R, 2005].

Questa interazione tra FKBP-51 e NF- κ B, responsabile della chemioresistenza e della crescita tumorale nel melanoma e nelle leucemie, viene riscontrata anche da Jiang nelle cellule di glioma. La crescita delle cellule neoplastiche risulta soppressa quando FKBP-51 viene inibito, mediante la tecnica RNA

interference, mentre è indotta dall'iperespressione di FKBP-51. Inoltre l'overespressione di questa immunofillina nelle cellule di glioma sensibili alla rapamicina determina una riduzione della risposta al farmaco. Dai risultati ottenuti emerge la capacità di FKBP-51 di controllare il pathway di NF- κ B e la risposta alla rapamicina nelle cellule di glioma[Jiang W, 2008].

Nel 2010 uno studio condotto sempre sul melanoma ha dimostrato il ruolo essenziale svolto da FKBP-51 nell'attivazione di NF- κ B indotta da radiazioni ionizzanti e nella conseguente radio resistenza, indicando questa immunofillina come possibile target per le strategie di radio sensibilizzazione [Romano S, 2010].

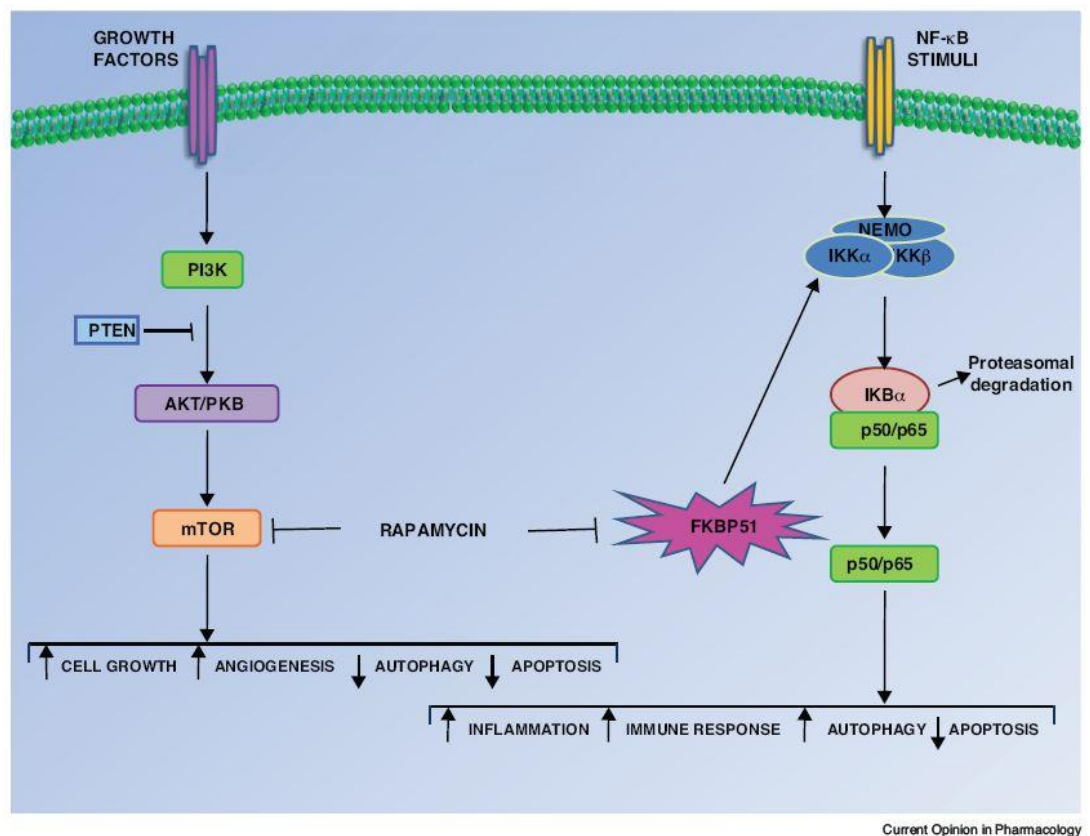


Figura 5: Rappresentazione schematica dei targets della rapamicina e delle vie di segnalazione bloccate dal farmaco: il pathway di PI3K/Akt mediante mTOR e il pathway di NF- κ B mediante FKBP-51 [Romano S, 2011]

3. Scopo dello Studio

Sulle premesse teoriche sin qui enunciate si inserisce il presente lavoro. Il suo scopo è stato quello di valutare l'espressione immunoistochimica di FKBP-51 in una serie di pazienti con CTCL, allo scopo di stabilire l'eventuale ruolo di tale proteina come nuovo marker di progressione tumorale e, quindi, come nuovo fattore prognostico per questo gruppo di neoplasie.

2. Materiali e metodi

Selezione dei casi

Dagli archivi del Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate dell'Università "Federico II" di Napoli, sezione di Anatomia Patologica, sono stati selezionati 30 casi di LC a cellule T rappresentativi dei sottogruppi con una maggiore incidenza nel periodo compreso tra Marzo 2008 e Marzo 2013. Sono stati selezionati solo i casi per i quali erano disponibili dati di follow-up clinico - patologico per un periodo non inferiore ai ventiquattro mesi.

In tutti i casi i margini di resezione chirurgica erano liberi da neoplasia. La diagnosi istologica è stata confermata in ogni caso valutato.

Per ogni caso, è stata selezionata un'inclusione paraffinata rappresentativa del tumore, da cui sono state ottenute sezioni seriate dello spessore di 4µm. Una delle sezioni è stata colorata con ematossilina/eosina ed è stata utilizzata per confermare la diagnosi iniziale; le rimanenti sono state utilizzate per l'indagine immunoistochimica.

Immunoistochimica

Le sezioni sottili relative ad ogni campione selezionato, montate su vetrini e in seguito riscaldate a 55°C per 60 min, sono state sparaffinate in xilene, reidratate e incubate con perossido d'idrogeno al 3% in metanolo per 20 min. a temperatura ambiente per disattivare le perossidasi endogene. E' stato effettuato lo smascheramento dell'antigene con microonde (750 mw per 3 min. per 2) in 10 mM di tampone citrato 0,01 M. Successivamente, le sezioni sono state trattate con siero bovino, diluito in PBS/BSA (1%), per 15 min. a temperatura ambiente, per evitare eventuali legami aspecifici dell'anticorpo

secondario. Dopo due lavaggi in soluzione tampone TRIS/HCl, è stato applicato per tutta la notte a 4°C l'anticorpo policlonale anti FKBP-51 (clone H-100, sc-13983 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC; diluizione 1:200). In seguito è stata applicata la metodica convenzionale biotina-streptavidina (labeled streptavidin-biotin-complex/ horse-radish AP; DAKO, Carpinteria, CA). L'avvenuta reazione è stata evidenziata con il cromogeno Fast Red allo scopo di evitare sovrapposizioni cromatiche con la melanina presente a livello cutaneo. Dopo un debole contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state, poi, montate con vetrino coprioggetto, attraverso un mezzo sintetico (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany).

Per ogni seduta di colorazione sono stati effettuati controlli positivi e negativi. Come controlli positivi sono state utilizzate sezioni di cute con dermatite cronica aspecifica. Come controlli negativi sono state utilizzate sezioni di timo. Il segnale è risultato in prevalenza nucleare, ma è stata riscontrata talvolta anche una colorazione citoplasmatica.

L'immunopositività è stata valutata come percentuale di cellule immunoreattive sul totale di cellule neoplastiche presenti in 10 campi rappresentativi a forte ingrandimento.

L'indice di positività per FKBP-51 è stato espresso semiquantitativamente secondo il seguente score:

- score 0 (assenza di cellule positive)
- score + (<5% di cellule positive)
- score ++ (5-<25% di cellule positive)
- score +++ (>25% di cellule positive).

La diagnosi istologica è stata confermata in maniera indipendente da due patologi, in assenza di informazioni riguardanti il paziente.

3. Risultati

Parametri clinico-patologici

La popolazione studio è risultata costituita da 30 pazienti (23 di sesso maschile e 7 di sesso femminile), con età media pari a 62 anni (range 29-96 anni).

Sono stati analizzati 23 casi di Micosi fungoide (11 in stadio chiazza, 5 in stadio placca, 6 in stadio tumorale, 1 caso Micosi fungoide follicolare) 6 Disordini Linfoproliferativi CD30+ (2 ALCL, 1 papulosi linfomatoide di tipo A, 1 papulosi linfomatoide di tipo B, 1 papulosi linfomatoide di tipo C, 1 papulosi linfomatoide non specificata), 1 caso CTCL NOS (Tabella 2).

Immunopositività per FKBP-51 nelle Micosi fungoidi

FKBP-51 è risultato espresso in tutti i casi di Micosi fungoide valutati. In particolare il livello di positività per FKBP-51 è risultato basso (+) nei casi a stadio chiazza, da basso (+) a moderato (++) nei casi a stadio placca (figura 6), da moderato (++) ad elevato (+++) nei casi a stadio tumorale a comportamento biologico più aggressivo (figura 7).

Immunopositività per FKBP-51 nel CTCL NOS

FKBP-51 è risultato espresso nel CTCL NOS con un livello di positività moderato (++).

Immunopositività per FKBP-51 nei Disordini linfoproliferativi CD30+

FKBP-51 è risultato espresso in tutti i casi di Disordini linfoproliferativi CD30+ valutati con un livello di positività da basso (+) a moderato (++).

Immunopositività per FKBP-51 nel timo e nelle dermatiti

Nei casi utilizzati come controllo, quali il timo e le dermatiti, l'espressione di FKBP-51 è risultata bassa (+) (figura 8).

4. Discussione e considerazioni conclusive

FKBP-51 è un immunofilina fisiologicamente espressa nei linfociti dove è connessa alla normale attività di quest'ultimi, ed in diversi tessuti. [Baughman 1997]. Da un punto di vista strutturale presenta due domini funzionali principali: un dominio TPR (tetratricopeptide repeats) responsabile dell'interazioni proteina-proteina con le heat shock protein HSP90 e HSP70, e un dominio N-terminale contenente l'attività peptidyl-prolyl isomerasica [Romano S, 2011]. Grazie a questi domini multifunzionali FKBP-51 è in grado di regolare diverse vie di segnalazione e partecipare a numerosi processi biologici vitali per la cellula [Romano S, 2011]. Dai numerosi studi condotti nell'ultimo ventennio su questa immunofilina, è emerso un suo ruolo chiave nei meccanismi molecolari caratterizzanti le neoplasie maligne dovuto alla sua capacità di interagire con proteine coinvolte nella resistenza all'apoptosi, nella proliferazione, nell'autorinnovamento cellulare, nei processi di invasione e metastatizzazione.

Tra le molteplici vie di segnalazione in cui FKBP-51 è coinvolta, la mia attenzione è stata rivolta al controllo del pathway di NF- κ B, poiché diverse evidenze sperimentali hanno dimostrato che questo fattore di trascrizione è costitutivamente attivato nei CTCL. [Sors A, 2006; Döbbeling U, 2007; Izban K.F., 2000; Sors A, 2008].

I meccanismi alla base dell'invasione e proliferazione linfocitaria nella cute restano poco chiari. Nei CTCL, NF- κ B costitutivamente attivato, potrebbe assumere un ruolo trascrizionale chiave nella patogenesi, regolando da un lato l'espressione di geni anti-infiammatori ed anti-apoptotici che contribuiscono alla aumentata proliferazione e sopravvivenza delle cellule neoplastiche, e dall'altra l'espressione di geni anti-infiammatori che permettono alle cellule neoplastiche di evadere la sorveglianza immunitaria determinando la natura

immunosoppressiva dei CTCL [Chang TP, 2013]. Il meccanismo alla base dell'attivazione costitutiva di NF- κ B nei CTCL resta, però, sconosciuto.

L'iperespressione di FKBP-51 nel melanoma contribuisce all'attivazione costitutiva di NF- κ B, con conseguente aumentata resistenza alla morte cellulare indotta sia dai trattamenti radio che chemioterapici [Romano MF, 2004; Romano S, 2010].

In questo lavoro è stata valutata per la prima volta l'espressione di FKBP-51 in una serie selezionata di CTCL.

FKBP-51 è risultato espresso in tutti i casi di LC a cellule T valutati. In particolare, nei casi di micosi fungoide, il livello di positività per FKBP-51 è risultato più elevato nelle micosi fungoide "tumorali", caratterizzate da un comportamento biologico più aggressivo e da una prognosi infausta, legata principalmente al fallimento dei trattamenti terapeutici e allo sviluppo di recidive. Allo stesso modo l'espressione dell'immunofillina è risultata elevata in un caso di CTCL/NOS, un linfoma cutaneo a comportamento aggressivo.

Un livello di espressione più basso è stato, invece riscontrato negli stadi iniziali di micosi fungoide (stadio chiazza e stadio placca) caratterizzati da un decorso clinico indolente e nei casi controllo di dermatite e di timo.

FKBP-51 iperespresso causa la deregolazione di vie di segnalazione cellulari importanti tra cui il pathway di NF- κ B, e questo nella micosi fungoide potrebbe condurre alla progressione della malattia e all'acquisizione di un fenotipo aggressivo. L'iperespressione di FKBP-51 nei casi più aggressivi potrebbe, inoltre, contribuire a motivare la sensibilità alla rapamicina riscontrata in diversi studi condotti sui CTCL e spiegata, ad oggi, unicamente mediante azione sul pathway di mTOR/Akt/PI3K [Kremer M, 2010; Marzec M, 2011].

Questi risultati preliminari ci permettono di ipotizzare un promettente ruolo di FKBP-51 come marker di progressione neoplastica nella micosi fungoide, ipotesi che va confermata mediante ampliamento della casistica e correlazione con altri fattori prognostici.

Quanto ottenuto rappresenta un punto di partenza per ulteriori studi che contribuiscano a comprendere meglio la patogenesi dei CTCL focalizzandosi sul ruolo chiave rivestito dal pathway di NF- κ B.

Considerata l'importanza di FKBP-51 nella progressione del ciclo cellulare, è inoltre ipotizzabile che il pathway di FKBP-51 possa divenire un potenziale target terapeutico, meritevole di ulteriori investigazioni.

5. Bibliografia

Alibert JLM (1806) Tableau du pian fongoide. Description des maladies de la peau, observees a l'Hospital Saint-Louis et exposition des meilleurs methods suivies pour leur traitement. Barrois L Aine Fils, Paris France.

Alonso, A.; Zaidi, T.; Novak, M.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(12), 6923-6928.

Auphan, N.; Di Donato, J.A.; Rosette, C.; Helmberg, A.; Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 1995, 270(5234), 286-290.

Avellino R, Romano S, Parasole R, Bisogni R, Lamberti A, Poggi V, Venuta S, Romano MF: Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2005, 106:1400-1406.

Baldwin AS Jr. 1996 Baldwin AS Jr. The NF-kB and IκB proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-83.

Baughman G, Wiederrecht GJ, Chang F, Martin MM, Bourgeois S: Tissue distribution and abundance of human FKBP51, an FK506-binding protein that can mediate calcineurin inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 232:437-443.

Baughman G, Wiederrecht GJ, Faith Campbell N, Martin MM, Bourgeois S. FKBP51, a novel T-cell specific immunophilin capable of calcineurin inhibition. *Mol Cell Biol* 1995; 15:4395-4402.

Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, Mariwalla K, Trinh J, Wang N, Edelson RL. Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1640-7.

Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, et al. (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6, 97-105.

Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5064-73.

Brown AM, Linhoff MW, Stein B, Wright KL, Baldwin AS, Jr., Basta PV, Ting JP. Function of NF-kappa B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF-kappa B/Rel subunits. *Mol Cell Biol.* 1994;14:2926-2935.

Caldenhoven, E.; Liden, J.; Wissink, S.; Van de Stolpe, A.; Raaijmakers, J.; Koenderman, L.; Okret, S.; Gustafsson, J.A.; Van der Saag, P.T. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(4), 401-412.

Chang TP, Vancurova I. NFkB function and regulation in cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Cancer Res.* 2013 Nov 1;3(5):433-445.

Cioffi DL, Hubler TR, Scammell JG. Organization and function of the FKBP52 and FKBP51 genes. *Curr Opin Pharmacol.* 2011 Aug;11(4):308-13.

DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NFkB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* 2012; 246: 379-400.

Döbbeling U. Transcription factor profiling shows new ways towards new treatment options of cutaneous T cell lymphomas. *Curr Drug Discov Technol.* 2007 Jun;4(1):24-30.

Dornan, J.; Taylor, P.; Walkinshaw, M.D. Structures of Immunophilins and their Ligand Complexes. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2003, 3(12), 1392-1409.

Ermertcan AT, Öztürk F, Gündüz K. Toll-like receptors and skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 Sep;25(9):997-1006.

Fischer, G.; Aumüller, T. Regulation of peptide bond cis/trans isomerisation by enzyme catalysis and its implication in physiological processes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 2003, 148, 105-150.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily onservd mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225 260+.

Girardi M, Heald PW, Wilson LD. The pathogenesis of mycosis fungoides. *N Engl J Med.* 2004 May 6;350(19):1978-88.

Giraudier S, Chagraoui H, Komura E, Barnache S, Blanchet B, Le Couedic JP, Smith DF, Larbret F, Taksin AL, Moreau-Gachelin F et al. Overexpression of FKBP51 in idiopathic myelofibrosis regulates the growth factor independence of megakaryocyte progenitors. *Blood* 2002, 100:2932-2940.

Goedert, M.; Wischik, C.M.; Crowther, R.A.; Walker, J.E.; Klug, A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 85(11), 4051-4055.

Greene MH, Dalager NA, Lamberg SI, Argyropoulos CE, Fraumeni JF Jr. Mycosis fungoides: epidemiologic observations. *Cancer Treat Rep*. 1979 Apr;63(4):597-606.

Greten, F.R. and M. Karin, The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett*, 2004. 206(2): p. 193-9.

Groves FD, Linet MS, Travis LB, Devesa SS. Cancer surveillance series: non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Aug 2;92(15):1240-51.

Guitart J. What's new in cutaneous T-cell lymphomas: 2006. *Semin Cutan Med Surg*. 2006 Jun;25(2):87-90.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224

Hansen SK, Baeuerle PA, Blasi F. Purification, reconstitution, and I kappa B association of the c-Rel-p65 (RelA) complex, a strong activator of transcription. *Mol Cell Biol*. 1994;14:2593-2603.

Heald PW, Glusac EJ. Unilesional cutaneous T-cell lymphoma: clinical features, therapy, and follow-up of 10 patients with a treatment-responsive mycosis fungoides variant. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Feb;42(2 Pt 1):283-5.

Hogan, P.G.; Chen, L.; Nardone, J.; Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*, 2003, 17(18), 2205-2232.

Izban K.F., Ergin M., Qin J-Z., Martinez R.L., Pooley R.J., Saeed S., Alkan S: Constitutive expression of NF-kB is a characteristic feature of mycosis fungoides: implications for apoptosis resistance and pathogenesis. *Hum. Pathol*. 31(12), 1482-1490, 2000.

Jarrousse V, Quereux G, Marques-Briand S, Knol AC, Khammari A, Dreno B. Toll-like receptors 2, 4 and 9 expression in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Eur J Dermatol* 2006;16:636-41.

Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): Part II. Prognosis, management, and future directions. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Feb;70(2):223.e1-223.e17.

Jiang W, Cazacu S, Xiang C, Zenklusen JC, Fine HA, Berens M, Armstrong B, Brodie C, Mikkelsen T: FK506 binding protein mediates glioma cell growth and sensitivity to rapamycin treatment by regulating NF-kappaB signaling pathway. *Neoplasia* 2008, 10:235-243.

Jinwal, U.K.; Koren, J 3rd.; Borysov, S.I.; Schmid, A.B.; Abisambra, J.F.; Blair, L.J.; Johnson, A.G.; Jones, J.R.; Shults, C.L.; O'Leary, J.C 3rd.; Jin, Y.; Buchner, J.; Cox, M.B.; Dickey, C.A. The Hsp90 cochaperone, FKBP51, increases Tau stability and polymerizes microtubules. *J Neurosci*, 2010, 30(2), 591-599.

Kang SM, Tran AC, Grilli M, Lenardo MJ. NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science*. 1992;256:1452-1456.

Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-663.

Kempf W, Sander CA. Classification of cutaneous lymphomas - an update. *Histopathology*. 2010 Jan;56(1):57-70.

Kempf W. CD30+ lymphoproliferative disorders: histopathology, differential diagnosis, new variants, and simulators. *J Cutan Pathol*. 2006 Feb;33 Suppl 1:58-70.

Kim EJ, Hess S, Richardson SK, Newton S, Showe LC, Benoit BM, Ubriani R, Vittorio CC, Junkins-Hopkins JM, Wysocka M, Rook AH. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J Clin Invest*. 2005 Apr;115(4):798-812.

Kremer M, Sliva K, Klemke CD, Schnierle BS. Cutaneous T-cell lymphoma cells are sensitive to rapamycin. *Exp Dermatol*. 2010 Sep;19(9):800-5.

Mao X, Orchard G, Lillington DM, Child FJ, Vonderheid EC, Nowell PC, Bagot M, Bensussan A, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. BCL2 and JUNB abnormalities in primary cutaneous lymphomas. *Br J Dermatol*. 2004 Sep;151(3):546-56.

Mao X, Orchard G, Lillington DM, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2003 Feb 15;101(4):1513-9.

Mao X, Orchard G, Mitchell TJ, Oyama N, Russell-Jones R, Vermeer MH, Willemze R, van Doorn R, Tensen CP, Young BD, Whittaker SJ. A genomic and expression study of AP-1 in primary cutaneous T-cell lymphoma: evidence for dysregulated expression of JUNB and JUND in MF and SS. *J Cutan Pathol*. 2008 Oct;35(10):899-910.

Marzec M, Liu X, Wysocka M, Rook AH, Odum N, Wasik MA. Simultaneous inhibition of mTOR-containing complex 1 (mTORC1) and MNK induces apoptosis of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells. *PLoS One*. 2011;6(9):e24849.

Morales-Suárez-Varela MM, Olsen J, Johansen P, Kaerlev L, Guénel P, Arveux P, Wingren G, Hardell L, Ahrens W, Stang A, Llopis A, Merletti F, Aurrekoetxea JJ, Masala G. Occupational risk factors for mycosis fungoides: a European multicenter case-control study. *J Occup Environ Med*. 2004 Mar;46(3):205-11.

Nickoloff BJ, Nestle FO, Zheng XG, Turka LA. T lymphocytes in skin lesions of psoriasis and mycosis fungoides express B7-1: a ligand for CD28. *Blood* 1994;83:2580-6.

Nielsen M, Kaestel CG, Eriksen KW, Woetmann A, Stokkedal T, Kaltoft K, Geisler C, Röpke C, Odum N. Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia*. 1999 May;13(5):735-8.

Niermann C, Schulze HJ, Hallermann C. [The history of lymphoma classifications with special consideration of cutaneous lymphomas]. *Hautarzt*. 2008 May;59(5):394-9.

Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*. 2012 Dec;45(6):487-98.

Pancake BA, Zucker-Franklin D, Coutavas EE. The cutaneous T cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. A study of 50 patients. *J Clin Invest* 1995;95:547-54.

Pigozzi B, Bordignon M, Belloni Fortina A, Michelotto G, Alaibac M. Expression of the CD1a molecule in B- and T-lymphoproliferative skin conditions. *Oncol Rep*. 2006 Feb;15(2):347-51.

Querfeld C, Rosen ST, Guitart J, Kuzel TM. The spectrum of cutaneous T-cell lymphomas: new insights into biology and therapy. *Curr Opin Hematol*. 2005 Jul;12(4):273-8.

Ray, A.; Prefontaine, K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(2), 752-756.

Rijlaarsdam JU, Meijer CJ, Willemze R. Differentiation between lymphadenosis benigna cutis and primary cutaneous follicular center cell lymphomas. A comparative clinicopathologic study of 57 patients. *Cancer*. 1990 May 15;65(10):2301-6.

Rijlaarsdam U, Willemze R. Cutaneous pseudo-T-cell lymphomas. *Semin Diagn Pathol*. 1991 May;8(2):102-8.

Romano MF, Avellino R, Petrella A, Bisogni R, Romano S, Venuta S. Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF-kappaB/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2829–2836.

Romano S, D'Angelillo A, Pacelli R, Staibano S, DeLuna E, Bisogni R, Eskelinen E-L, Mascolo M, Cali' G, Arra C, Romano MF: Role of FK506 binding protein 51 (FKBP51) in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells. *Cell Death Differ* 2010, 17:145-157.

Romano S, Di Pace A, Sorrentino A, Bisogni R, Sivero L, Romano MF. FK506 binding proteins as targets in anticancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2010; 10: 651–656; Review).

Romano S, Mallardo M, Romano MF. FKBP51 and the NF-κB regulatory pathway in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Aug;11(4):288-93

Romano S, Sorrentino A, Di Pace AL, Nappo G, Mercogliano C, Romano MF: The emerging role of large immunophilin FK506 binding protein 51 in cancer. *Curr Med Chem* 2011, 18:5424–5429.

Scheinman, R.I.; Gualberto, A.; Jewell, C.M.; Cidlowski, J.A.; Baldwin, A.S. Jr. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(2), 943-953.

Sen, R. and D. Baltimore, Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986. 47(6): p. 921-8.

Sen, R. and D. Baltimore, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, 1986. 46(5): p. 705-16.

Slater DN. The new World Health Organization-European Organization for Research and Treatment of Cancer classification for cutaneous lymphomas: a practical marriage of two giants. *Br J Dermatol*. 2005 Nov;153(5):874-80.

Somarelli JA, Lee SY, Skolnick J, Herrera RJ. Structure-based classification of 45 FK506-binding proteins. *Proteins* 2008; 72:197-208.

Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, Wasik M, Lovato P, Brender C, Eriksen KW, Woetmann A, Kaestel CG, Nissen MH, Ropke C, Skov S, Ødum N. In vivo activation of STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia*. 2004 Jul;18(7):1288-95.

Sors A, Jean-Louis F, Bégué E, Parmentier L, Dubertret L, Dreano M, Courtois G, Bachelez H, Michel L. Inhibition of IkappaB kinase subunit 2 in cutaneous T-cell lymphoma down-regulates nuclear factor-kappaB constitutive activation, induces cell death, and potentiates the apoptotic response to antineoplastic chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):901-11.

Sors A, Jean-Louis F, Pellet C, et al. Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood* 2006;107:2354-2363.

Steckschulte LA, Sanchez ER. FKBP51-a selective modulator of glucocorticoid and androgen sensitivity. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Aug;11 (4):332-7.

Storz M, Zepter K, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Haffner AC. Coexpression of CD40 and CD40 ligand in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Cancer Res* 2001;61: 452-4.

Swerdlow S, Campo E, Harris N, Jaffe E, Pileri S, Stein H, Thiele J, Vardiman J. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4th edn.) IARC, Lyon France.

Wang L. FKBP51 regulation of AKT/protein kinase B phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Aug;11(4):360-4.

Weiwad, M.; Edlich, F.; Kilka, S.; Erdmann, F.; Jarczowski, F.; Dorn, M.; Moutty, M.C.; Fischer, G. Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. *Biochemistry*, 2006, 45(51), 15776-15784.

Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, Ralfkiaer E, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Duncan LM, Grange F, Harris NL, Kempf W, Kerl H, Kurrer M, Knobler R, Pimpinelli N, Sander C, Santucci M, Sterry W, Vermeer MH, Wechsler J, Whittaker S, Meijer CJ. WHO EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*. 2005 May 15;105(10):3768-85.

Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Peréz JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, van Vloten WA, Meijer CJ. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood*. 1997 Jul 1;90(1):354-71.

Wong HK, Mishra A, Hake T, Porcu P. Evolving insights in the pathogenesis and therapy of cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sezary syndrome). *Br J Haematol*. 2011 Oct;155(2):150-66.

Wood GS, Schaffer JM, Boni R, Dummer R, Burg G, Takeshita M, et al. No evidence of HTLV-I proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol* 1997;150:667-73.

Zoi-Toli O, Vermeer MH, De Vries E, Van Beek P, Meijer CJ, Willemze R. Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. *Br J Dermatol*. 2000 Aug;143(2):313-9.

Zucker-Franklin D, Pancake BA. The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I and II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Semin Dermatol*. 1994 Sep;13(3):160-5.

Tabelle

Tabella 2: Parametri clinico-patologici ed espressione immunoistochimica di FKBP-51 nei CTCL

N°	Anno	Sesso	Età	Diagnosi	FKBP-51
1	2010	F	70	ALCL	+
2	2011	M	36	Papulosi linfomatoide	+
3	2011	M	72	MF stadio di chiazza	+
4	2011	M	74	MF stadio nodulo-tumorale	++
5	2011	M	96	MF stadio di chiazza	+
6	2011	M	64	MF stadio di chiazza	+
7	2011	M	54	MF stadio di placca	+
8	2012	M	63	CTCL NOS	++
9	2012	F	76	MF stadio di placca	++
10	2012	M	81	MF stadio di chiazza	+
11	2012	M	29	MF stadio di chiazza	+
12	2012	M	67	MF stadio di chiazza	+
13	2012	M	63	MF stadio nodulo-tumorale	+++
14	2012	M	59	MF stadio di chiazza	+
15	2012	F	41	MF stadio di placca	++
16	2012	M	64	MF stadio di chiazza	+
17	2008	F	66	ALCL	+
18	2008	F	54	Papulosi linfomatoide	+
19	2009	M	66	MF stadio nodulo-tumorale	+++
20	2009	M	66	MF stadio nodulo-tumorale	+++
21	2009	M	47	Papulosi linfomatoide	+ / ++
22	2010	M	56	MF stadio nodulo-tumorale	+++
23	2011	M	42	Papulosi linfomatoide	+ / ++
24	2012	M	76	MF stadio di chiazza	+
25	2012	M	73	MF stadio di placca	+
26	2012	F	65	MF stadio di placca	+
27	2012	M	51	MF follicolotropa	+
28	2013	F	57	MF stadio di chiazza	+
29	2013	M	67	MF stadio nodulo-tumorale	+++
30	2013	M	72	MF stadio di chiazza	+

Legenda: ALCL: linfoma primitivo cutaneo anaplastico a grandi cellule, CD30+;
MF: micosi fungoide; CTCL NOS: linfoma T periferico non altrimenti specificato.

Iconografia

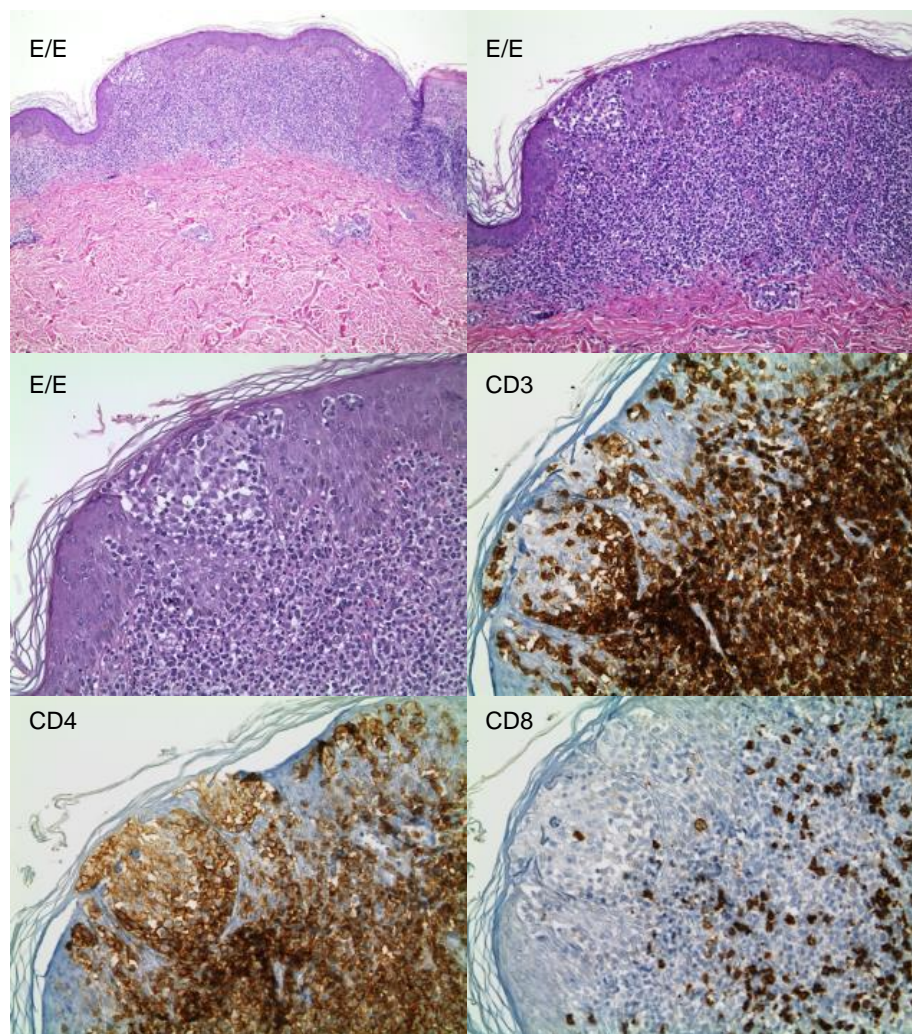


Figura 2: Micosi fungoide fase nodulare caratterizzata dall'immunofenotipo BF1+, CD3+, CD4+, CD5+, CD8-, CD45RO+.

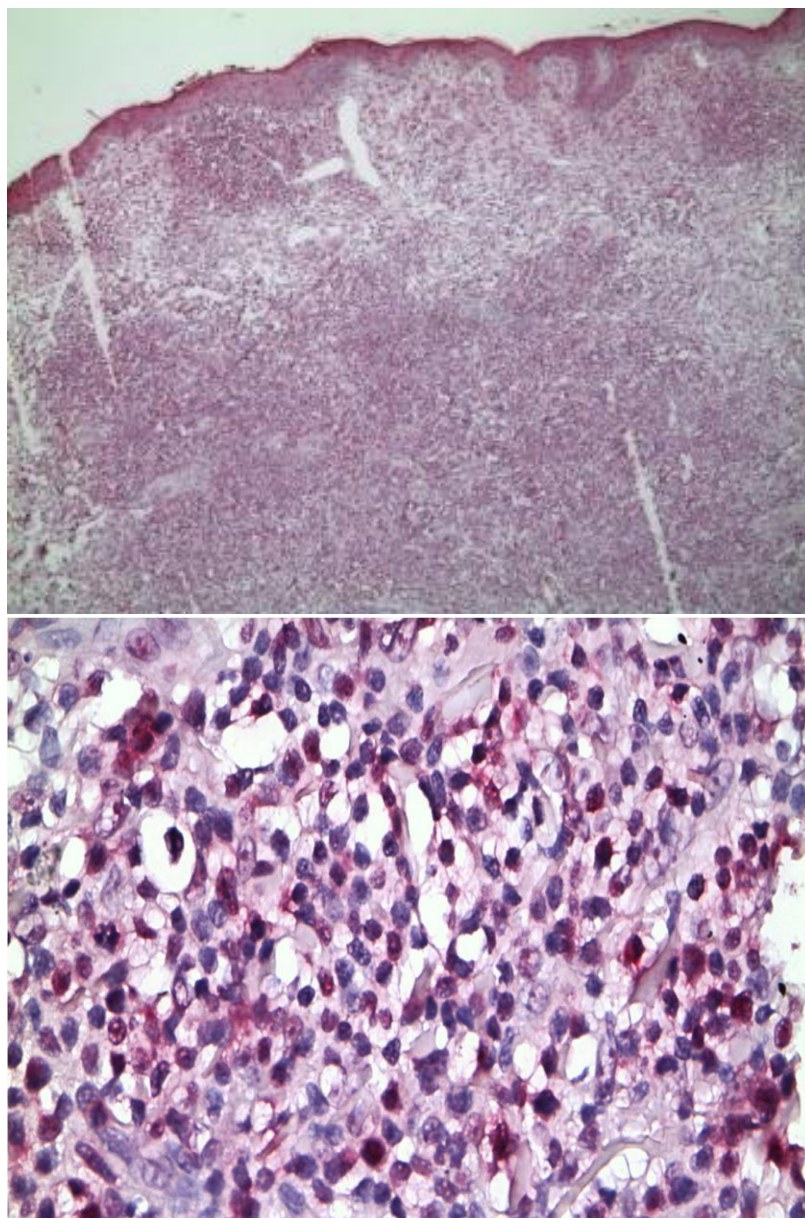


Figura 7: Espressione immunoistochimica di FKBP-51 in una micosi fungoide fase nodulare

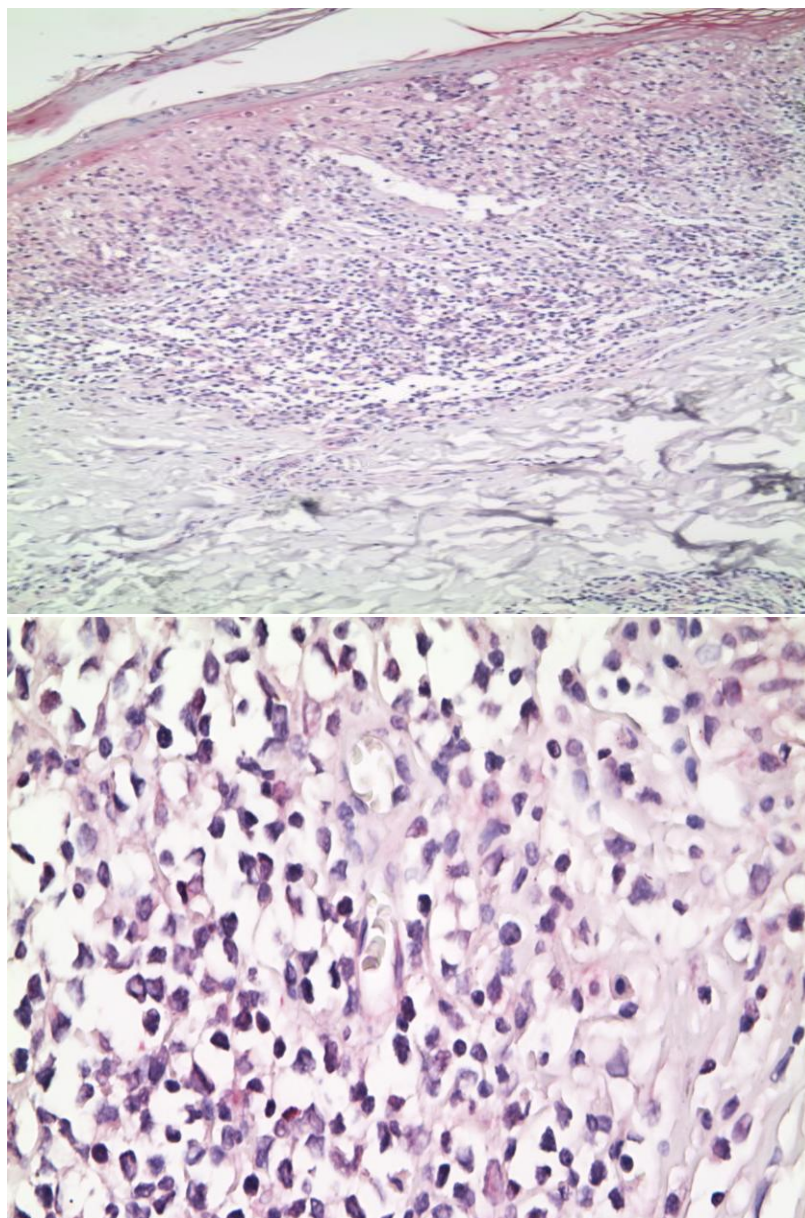


Figura 6: espressione immunoistochimica di FKBP-51 in una micosi fungoide fase placca

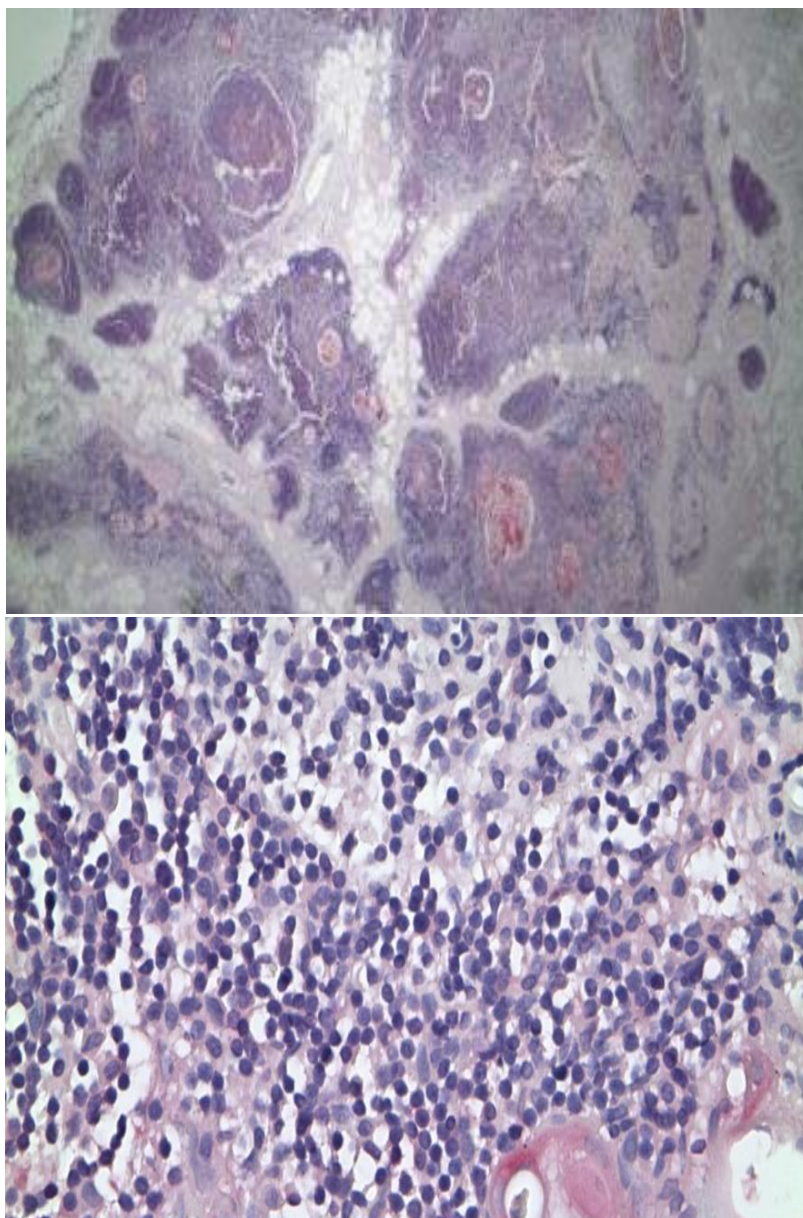


Figura 8: espressione immunoistochimica di FKBP-51 nel timo